



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0087280 호  
Application Number 10-2003-0087280

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 03일  
Date of Application DEC 03, 2003

출 원 인 : 주식회사 팬제노믹스  
Applicant(s) PanGenomics Co., Ltd.

2004년 12월 27일

특 허 청  
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

**【서지사항】**

【류명】 특허 출원서  
【리구분】 특허  
【수신처】 특허청장  
【발조번호】 0002  
【제출일자】 2003.12.03  
【발명의 명칭】 헝지방화 및 항비만 활성을 갖는 박과 식물 추출물 또는  
이로부터 분리한 성분들을 포함하는 조성물  
【발명의 영문명칭】 Composition comprising the extract of Cucurbita spe.  
or purified extract isolated therefrom having  
Anti-adipogenic and Anti-obesity activity  
【출원인】  
【명칭】 주식회사 맨제노믹스  
【출원인 코드】 1-2001-027094-7  
【대리인】  
【성명】 신동인  
【대리인 코드】 9-2000-000156-1  
【포괄위임등록번호】 2002-050561-1  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 진미림  
【성명의 영문표기】 JIN,Mi Rim  
【주민등록번호】 660327-2023110  
【우편번호】 135-272  
【주소】 서울특별시 강남구 도곡2동 티워밸리스 1차 A동 3905호  
【국적】 KR  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 류재하  
【성명의 영문표기】 RYU,Jae Ha  
【주민등록번호】 590709-1042328  
【우편번호】 158-756  
【주소】 서울특별시 양천구 목6동 목동6동 신시가지아파트 601동  
402호  
【국적】 KR

【성명】

최현정

【성명의 국문표기】

CHOI, Hyoun Jeong

【성명의 영문표기】

780513-2496222

【주민등록번호】

406-810

【우편번호】

인천광역시 연수구 연수1동 479-7 등원주택 401호

【주소】

KR

【국적】

【성명】

정형진

【성명의 국문표기】

JUNG, Hyung Jin

【성명의 영문표기】

730223-1079417

【주민등록번호】

137-042

【우편번호】

서울특별시 서초구 반포2동 주공아파트 210-303

【주소】

KR

【국적】

【성명】

박경철

【성명의 국문표기】

PART, Kyoung Chul

【성명의 영문표기】

770504-1691811

【주민등록번호】

151-818

【우편번호】

서울특별시 관악구 봉천7동 1510-2 에이스빌 20호

【주소】

KR

【국적】

【성명】

김선영

【성명의 국문표기】

KIM, Sun Young

【성명의 영문표기】

551103-1074314

【주민등록번호】

140-724

【우편번호】

서울특별시 용산구 이촌동 300-127 한강맨션아파트

18-302

【국적】

KR

【사정구】

청구

【신설임기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】

1

【서열목록의 전자파일】

첨부

【지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인  
신동인 (인)

수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【기산출원료】 34 면 34,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 13 항 525,000 원

【합계】 588,000 원

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 176,400 원

【부서류】 1. 요약서·영세서(도면)\_1종 2.소기업임을 증명하는  
서류\_1종

## 【요약서】

### 【약】

본 발명은 항지방화(anti-adipogenesity) 활성 및 항비만 활성을 갖는 박과  
ucurbita) 식물의 추출물 또는 이로부터 분리한 정제물을 함유하는 조성물을 제공  
는 것으로, 본 발명의 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 정제물은 비만 생쥐  
서 체중 감소 작용을 나타내고, 중성 지질 및 콜레스테롤 저하 작용을 나타내며,  
독시즘 증식 활성 수용체 알파 및 델타 (Peroxisome Proliferator Activated  
ceptors alpha and delta, PPAR  $\alpha$  &  $\delta$ )를 활성화하며, 스테로일-코에이 디세추  
이즈 (Steroyl-CoA Desaturase)의 발현을 저하시킬 뿐 아니라, 미성숙 지방 세포의  
방화 작용을 차단하므로, 비만 또는 과도한 지질 축적으로 인해 발생하는 비만, 계  
당뇨병, 지방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 등백경화증 등의 대사성 질환의 예방,  
선 및 치료를 위한 의약품 및 건강기능 식품으로 사용할 수 있다.

### 【표도】

도 1a

### 【인어】

나 식물, 추출물, 정제물, 피특시즘 증식 활성 수용체, 스테로일-코에이 디세추레이  
지방화, 비만, 지방, 대사성 질환, 의약품, 건강 기능 식품



【명세서】

【명의 명칭】

항지방화 및 항비만 활성을 갖는 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물

포함하는 조성물[Composition comprising the extract of *Cucurbita* spe. or

ified extract isolated therefrom having Anti-adipogenic and Anti-obesity  
ivity】

【면의 간단한 설명】

도 1a 및 1b는 박과 식물 열수 추출물의 지방세포(3T3-L1) 분화 및 중성지방의  
제효과를 측정한 것으로, 도 1a는 분화된 세포 내에 축적된 지방의 양을 오일 레드  
염색법으로 염색하여 관찰한 도이고, 도 1b는 염색된 정도를 대조군을 100으로 보  
자해율(%)을 나타낸 도이며.

도 2a 및 2b는 호박 줄기 각 용매 분획물의 지방세포(3T3-L1) 분화 및 중성지  
의 억제효과를 측정한 것으로, 도 2a는 분화된 세포 내에 축적된 지방의 양을 오일  
레드 오염색법으로 염색하여 관찰한 도이고, 도 2b는 염색된 정도를 대조군을 100  
로 보고 자해율(%)을 나타낸 도이며.

도 3은 호박 줄기의 추출물로부터 분리한 경제물(CMC-9)의 지방세포 분화  
T3-L1) 및 중성지방 억제 효과를 측정한 도이며.

도 4는 호박 줄기의 열수 추출물의 지방세포 분화시 유전자 발현 조절 효과를  
정한 도이며.

도 5는 호박 즙기의 열수 추출물, 각 용매 분획물 및 경제물(CMC-9)의 PPARs 활화에 미치는 효과를 측정한 도이고.

도 6a 및 6b는 고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 호박 열수 추출물(PG105)의 혈중 중성지질 함량에 미치는 효과를 측정한 것으로, 도 6a는 6주 후에 측정한 결과도이, 도 6b는 13주 후에 측정한 결과도이고.

도 7a 및 7b는 고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 호박 열수 추출물(PG105)의 혈 콜레스테롤 함량에 미치는 효과를 측정한 것으로, 도 7a는 6주 후에 측정한 결과이고, 도 7b는 13주 후에 측정한 결과도이며.

도 8은 고지방 식이를 13주간 섭취한 생쥐에서 호박 열수 추출물(PG105)이 지방에 미치는 효과를 측정한 도이고.

도 9는 고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 호박 열수 추출물(PG105)의 간의 중성지에 미치는 효과를 측정한 도이며.

도 10a 및 10b는 고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 호박 열수 추출물(PG105)의 지대사 관련 유전자 빌현에 미치는 효과를 측정한 도이며.

도 11a 및 11b는 비만생쥐 모델(db/db)에서 호박 열수 추출물(PG105)의 체중감 및 지질 조절 효과를 측정한 것으로, 도 11a는 체중감소 효과를 측정한 도이고, 11b는 혈 중 중성지질 함량을 측정한 도이며.

도 12는 박과 식물의 클로로포름 가용성 분획물의 TLC(전개용매: 클로로포름: 탄올=20:1) 결과도이고.

도 13은 박과식물로부터 분리한 정제물 (CMC-9)의 HPLC 크로마토그램에 관한 도  
다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 항지방화 (anti-adipogenecity) 활성 및 항비만 (anti-obesity) 활성  
갖는 박과 식물의 추출물 또는 이로부터 분리한 정제물을 함유하는 비만 및 지질  
련 대사성 질환의 예방, 개선 및 치료에 유효한 조성물에 관한 것이다.

지방화 (Adipogenesis)란 미성숙지방세포 (preadipocyte)로부터 지방세포가 분화  
어 지방을 축적하게 되는 과정으로서, 이는 비만 (obesity), 당뇨병 (diabetes), 지  
간 (steatosis), 심장 질환 (coronary heart disease)과 같은 질병을 일으킬 수 있는  
위험 요인으로 알려져 있다. 성숙한 지방 세포 (adipocytes or fat cells)는 섬유아  
포 (fibroblast)와 같은 미성숙지방세포 (preadipocytes)로부터 분화되어 궁극적으로  
세포 내에 지방 방울 (lipid droplet)을 형성하게 된다. 지방세포의 분화 과정은  
3-11과 같은 세포를 이용하여 연구되어 왔으며, 여러 종류의 전사인자  
(transcription factor)들, 특히 지방화에 관여하는 것으로 알려진 전사인자,  
EBP (CAAT enhancer binding proteins), PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated  
receptors) 와 ADD/SREBPs (Adipocyte determination and differentiation dependent  
cofactor/sterol regulatory element-binding proteins) 등이 시간의 차이에 따라 발현

며 그 과정을 조절한다는 것이 알려져 있다 (Bart A Jessen et al., *Gene*, 299, 95-100, 2002; Darlington et al., *J. Biol. Chem.*, 273, pp30057-30060, 1998; un R.P et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 8, pp826-832, 1996).

I (isobutylmethylxanthin, dexamethason and insulin)와 같은 호르몬의 자극이 주칠 때, C/EBP b 와 d가 가장 먼저, 일시적으로 발현되며, 지방세포로의 분화를 개하게 한다 (Reusch J. E et al., *Mol. Cell. Biol.*, 20, pp1008-1020, 2000). 이는 속해서 C/EBP $\alpha$  와 PPAR $\gamma$ 의 발현 증가를 유도하게 된다 (James M. N. et al., 130, pp3122S-3126S, 2000). PPAR $\gamma$ 는 특히 지방세포 분화에 중요한 전사인자로 알려져 있으며, 레티노산 X 수용체 (retinoic acid X receptor) 단백질 (RXR)과 이합체 (imer)를 형성한 뒤, 다양한 지방세포 유전자의 프로모터 (promoter)에 존재하는 RE (Peroxisome Proliferator response elements)에 결합한다 (Tontonoz P.E et al., *Cell Dev.*, 9, pp1224-1234, 1994; Hwang, C. S et al., *Cell Dev. Biol.*, 13, 873-877). PPAR $\gamma$  와 C/EBP $\alpha$ 의 상호 작용이 성숙한 지방세포로의 분화에 매우 결정인ade, 지방산 결합 단백질 aP2와 같은 지방세포 특이적 단백질 및 지방 대사 효소 발현을 조절한다. 더불어 ADD1/SREBPs는 지방 대사에도 중요한 역할을 하지만, 또 분화과정에도 관여하는 것으로 알려졌다. 미성숙 지방세포에서 ADD1/SREBP1c가 현되는 것은 PPAR $\gamma$ 의 활성화에 기여하는 것으로 여겨진다 (Rosen E.D. et al., 1, pp145-171, 2000; Osborn T.F., *J. Biol. Chem.*, 275, pp32379-32392, 2000). 분화정을 마친 지방세포만이 지방산 (fatty acid)을 합성하고 중성지질 (triglycerides) 저장하게 된다.

반면, 지방대사의 항상성은 지방의 생성과 분해간의 균형에 의해서 유지된다. D1/SREBP1은 지방생성을 조절하는 전사인자로서, 지방산, 중성지질, 콜레스테롤, 지질 등의 합성과 흡수를 조절한다 (Horton J.D. et al., *J. Clin. Invest.*, **109**, 1125-1131, 2002). SREBPs는 소포체막에 결합한 불활성 전구체로 합성되고, N 말이 잘려나간 후, 활성화되어 핵으로 이동하게 되고 조절 유전자 프로모터의 E(sterol regulatory elements)에 결합하게 된다. 그 이형질체 중 SREBP1c는 중성지질의 합성을 주로 조절하는 반면, SREBP2는 콜레스테롤 합성에 관여하는 것으로 알렸다. SREBP1c에 의해 조절되는 유전자는 ACL(ATP citrate lyase), ACC(acetyl CoA carboxylase), FAS(fatty acid synthase)와 SCD(stearoyl-CoA desaturase) 등이다 (Sborn TF et al., *J. Biol. Chem.*, **275**, pp32379-32382, 2000; Soezig L. L et al., *J. Biol. Chem.*, **277**, pp 35625-35634, 2002). 지방 분해를 조절하는 데는 PPAR가 중요한 조절을 하는 것으로 알려져 있다 (Beisiegel, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, pp13656-13661, 1999). 지방산의 흡수 및 지방산 분해에 관여하는 L(lipoprotein lipase), 아포프로테인 (apoproteins), ACO(Acyl-CoA oxidase), 티오이즈 (thiolase) (Dreyer C et al., *Cell*, **68**, pp 879-887, 1992) 등이다.

비만은 소모하는 열량에 비해 과다한 열량을 섭취함으로써 여분의 열량이 체내 지방의 형태로 축적되어지는 현상을 말한다. 비만은 유전적 영향, 서구화되는 식생활에 의한 환경적인 영향, 스트레스에 의한 심리적인 영향 등 다양한 원인에 의해 발생되어지는 것으로 생각되고 있으나 아직 그 정확한 원인이나 기작에 관해서는 명히 정립된 바가 없는 상황이다. 그러나 비만은, 비만 그 자체가 갖는 문제점뿐만 아니라, 심혈관계 질환이나 당뇨와 같은 질병의 원인으로도 작용할 수 있기 때문에

anson et al., *New England J. Med.*, 333, pp677-685, 1995; Kopelman P.G., 404

635-643, 2000; Must et al., *JAMA*, 282, pp1523-1529, 1999) 전 세계적으로 비만

료에 많은 관심이 모아지고 있다.

현재까지 알려진 비만치료제들 중에서 가장 대표적인 약물들로는 제니칼  
enical™, 로슈제약회사, 스위스), 리덕탈 (Reductil™, 애보트사, 미국), 엑소리제  
xolise™, 아토파마, 프랑스) 등이 있으나 심장질환, 호흡기 질환, 신경계질환 등의  
작용과 함께 그 효능의 지속성이 낮아, 더욱 효율적인 비만치료제의 개발이 필요한  
정이다.

현재 비만치료제 개발 전략은 식사량 감소, 열량흡수의 억제, 빌엽반응 촉진,  
너지 대사 조절, 신경계를 통한 신호전달 조절과 같은 것들이다 (Kopelman P.G.,  
*ture*, 404, pp635-643, 2000). 이러한 전략에 대하여 어느 하나 이상의 기능을 할  
있도록 약물을 개발함으로써 비만치료에 이용하고자 하는 시도는 오랫동안 이어  
오고 있으나, 아직까지 안전성과 효능을 동시에 갖고 있는 약물을 개발하는 것이  
지 않은 것이 현실이다.

따라서 안전성이 입증된 천연물로부터 비만 치료 전략에 부합하는 성분을 찾아  
물로써 이용하려는 시도는 합성제제로부터 치료제를 개발하는 것에 비해 더욱 효율  
인 접근방법이라 할 수 있을 것이다.

박과 (*Cucurbitaceae*)는 쟁떡잎식물 박목의 한 과로, 덩굴식물로서 한해살이 또  
여러해살이풀이다. 잎은 어긋나고 흡잎이거나 손바닥 모양 또는 손바닥 모양의 띡  
있으며 잎자루가 길다. 잎자루 밑동에 덩굴손이 있으며 끊임은 없다. 열대와 아열  
에 약 95속 800여 종이 분포하며, 한반도에는 새박 (*Melothria japonica*)

의 (*Schizopepon bryoniaefolius*)·돌외 (*Gynostemma pentaphyllum*) 등이 자생하고 호  
·오이·수세미 등을 재배한다.

호박 (*Cucurbita moschata* DUCH.)은 박과 식물의 열매로서 맛은 달고 성질은 평  
하며, 쿠커비틴 (*Cucurbitine*), 지방유, 단백질 및 비타민 A·B<sub>1</sub>·B<sub>2</sub>·C를 함유하고 또  
로텐도 함유한다. 지방유의 주된 성분은 리놀렌산 (*linoleic acid*), 올레인산 (*oleic acid*), 스테아린산 (*stearic acid*) 등의 글리세린 에스테르 (*glycerin ester*)이며, 약  
효과로는 구충 (驅蟲) 작용이 있음이 증명되었다 (신민교, 정보석, *향약대사전*, 영  
사, pp850-952, 1998).

수박 (*Citrullus vulgaris* SCHRAD.)은 박과 식물의 열매로서 맛은 달고 성질은  
며, 수박의 과즙에는 시트룰린 (*citrulline*), 알라닌 (*alanine*),  $\alpha$ -아미노산, 글루  
산 (*glutamic acid*), 아르기닌 (*arginine*), 사과산, 글리콜 (*glycol*), 아데닌  
(*adenine*), 과당, 포도당, 비타민 C,  $\beta$ -카로텐 (*carotene*) 등이 함유되어 있다. 과육  
의 시트룰린 및 아르기닌에는 쥐 간장 중의 요소형성을 증진하여 이뇨작용을 인도  
는 효능이 있다고 한다 (신민교, 정보석, *향약대사전*, 영림사, pp945-947, 1998).

수세미 (*Luffa cylindrica* (L.) ROEM.)는 박과 식물의 열매로서 1년생 굴성 식  
물로 수세미 오이라고도 불리는데, 열매는 길이가 60 cm에 달하며 겉에 세로 주름이  
고 안쪽에는 그물 모양의 판다발이 있는데 껍질을 벗기고 과육과 씨를 제거하면 스  
지같이 되어 이것을 목욕 및 설것이 할 때 사용하며, 가을철에 줄기의 결단면에서  
오는 수액은 화장수로 이용할 수 있다 (신민교 및 정보석, *향약대사전*, 영림사,  
954-957, 1998).

본 발명자들은 천연물로부터 비만 치료에 효과가 있는 성분을 찾기 위하여 다양  
식물의 효능을 검색하던 중 호박, 수박, 수세미와 같은 박과 식물의 추출물로부터  
항지방화 및 항비만 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 항지방화(anti-adipogenesity) 활성 및 항비만 활성을 갖는  
과(Cucurbita) 식물의 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물을 함유하는 조성물을  
공하는 것으로, 본 발명의 박과 식물의 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물은 지  
조직 및 비지방 조직의 지방의 양을 감소시킴으로서 지질대사 이상으로 발생되는  
만, 제 2형 당뇨병, 지방간, 심혈관 질환, 동맥 경화증과 같은 대사성 질환의 예방  
개선 및 치료에 유용하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 의약품 또는 건강기능식  
을 등을 제공하고자 한다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항지방화(anti-adipogenicity) 활성  
항비만(anti-obesity) 활성을 갖는 박과 식물의 추출물 또는 이로부터 분리한 경  
제물(CMC-9)을 함유하는 비만 및 지질 관련 대사성 질환의 예방, 개선 및 치료에 유  
한 조성물을 제공한다.

본 발명의 상기 박과 식물의 추출물로부터 분리한 경제물(CMC-9)은,

(a) 건조한 박과 식물 줄기 또는 잎의 건조증량의 약 5배 내지 15배 분량의 물을 가하고 열수추출한 후 강압여과하고 여과액은 회전진공농축기로 김압농축한 다음 결건조하여 박과 식물의 열수 추출물을 수득하는 제 1단계;

(b) 상기 박과 식물의 열수 추출물을 물에 혼탁한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸세테이트, 부탄을 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 박과 식물의 각 용에 가용한 분획물을 수득하는 제 2단계;

(c) 상기 박과 식물 클로로포름 가용성 분획물을 용출용매로 헥산:클로로포름:탄올 (16:15:1)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Silica gel column chromatography)를 수행하여 11개의 분획으로 분리하는 제 3단계;

(d) 상기 분획 9를 용출용매로 클로로포름:메탄올 혼합용매를 사용하여 기울기 리법으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 용출한 후, 메탄올을 이동상으로 세미-프렙 HPLC (semi-prep HPLC)를 수행하여 수득한 용출액을 농축하여 정제물을 득하는 제 4단계로 이루어진 제조공정을 포함하는 제조방법으로 분리 수득되고, 도와 같은 TLC 양상을 가지는 항지방화 (anti-adipogenecity) 활성 및 항비만 (anti-obesity) 활성을 갖는 박과 식물 추출물로부터 분리한 정제물 (CMC-9)을 얻을 있다.

따라서, 본 발명은 항지방화 활성 및 항비만 활성을 갖는 박과 식물의 추출물은 박과 식물의 추출물로부터 상기 방법으로 분리하여 수득한 정제물을 함유하는 만 및 자질 관련 대사성 질환의 예방, 개선 및 치료에 유효한 약학 조성물을 제공한다.

상기 박과 식물은 호박 (*Cucurbita moschata* DUCH.), 수박 (*Citrullus vulgaris* HRAD.), 수세미 (*Luffa cylindrica* ROEM.), 참외 (*Cucumis melo* L. var. *nakura* KINO), 박 (*Lagenaria siceraria* STANDL. var. *depressa* HERA.) 등의 박과 식물로부 선택된 것, 바람직하게는 호박, 수박 및 수세미로부터 선택된 것을 사용할 수 있

또한, 상기 박과 식물은 전초, 열매, 줄기 및 잎을 사용할 수 있으며, 바람직하는 박과 식물의 줄기 또는 잎을 사용할 수 있다.

상기 비만 및 지질 관련 대사성 질환은 비만, 제 2형 당뇨병, 지방간,

지혈증, 심혈관 질환, 동맥 경화증을 포함한다.

상기 추출물은 조추출물 또는 비극성 용매 기용 추출물로써, 조추출물은 물, 에을, 메탄올과 같은 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게 물로 추출한 것을 포함하고, 비극성용매 기용 추출물은 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 또는 에틸 아세테이트로부터 선택된 비극성용매, 바람직하게는 클로로포름으로 추출한 것을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 박과 식물의 조추출물 및 비극성용매 기용추출물은 하기와 같이 수득 수 있다. 먼저, 본 발명의 박과 식물 조추출물은 박과 식물 줄기 또는 잎을 건조 후, 박과 식물 줄기 또는 잎 건조 중량의 약 1 내지 25배의 부피, 바람직하게는 5 내지 15배 분량의 물, 에탄올, 메탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 람직하게는 물로 20 내지 100 °C, 바람직하게는 70 내지 100 °C의 추출온도에서 약

0 분 내지 1일 동안, 바람직하게는 30 분 내지 2시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 냄각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수 추출로 1회 내 5회, 바람직하게는 3회 추출하여 감압여과하고 여과액은 회전진공농축기를 사용하 감압농축하고 동결건조하여 열수 추출물로써 박과 식물 조추출물을 수득할 수 있

상기 박과 식물 조추출물은 물에 혼탁한 후, 혼산, 클로로포름, 텔아세테이트, 부탄을 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 박과 식물 비극 용매 가용 추출물, 바람직하게는 클로로포름 가용성 추출물을 수득할 수 있으며. 더 구체적으로는 박과 식물 조추출물 즉, 박과 식물 열수 추출물에 혼산을 가하여 산 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있고, 다시 상기 수가용성 분획물을 클로로포름으로 추출하여 수가용성 분획물 및 클로로포름 가용성 분획물을 수득할 수 있으며, 이 수가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있고, 마지막으로 상기 수가용성 분획물 부탄을 추출하여 부탄을 가용성 분획물과 수가용성 분획물을 수득할 수 있다. 또한, 상기 박과 식물 추출물로부터 분리한 경제률(CMC-9)은 상기의 제조 공정으로 수득된 박과 식물 분획물들의 항지방화 및 항비만 활성을 측정하여, 이들 중 가 우수한 활성을 보인 박과 식물의 클로로포름 가용성 분획물에 대하여 용출용매로 산:클로로포름:메탄올(16:15:1) 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래 (Silica gel column chromatography)를 수행하여 11개의 분획으로 분리한 후, 다시 11개 분획들의 항지방화 활성을 측정하여, 이들 중 가장 우수한 활성을 보인 분획 9 용출용매로 클로로포름:메탄올(30:1) 혼합용매를 사용하여 기울기 용리법으로 실

카릴 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후, 이를 더욱 순수하게 분리하기 위하여 20% 70 %의 메탄올을 이등상으로 하여 HPLC(40 % 메탄올 용매, 2 mL/분 유속)를 수합으로서 26.8분에 용출되고 TLC(클로로포름: 메탄올=20:1)에서 Rf 0.32를 나타내 본 발명의 경제물(이하, CMC 9이라 함)을 수득할 수 있다.

본 발명의 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물(CMC-9)은 미성숙 자세포의 지방화 작용을 차단함을 확인하였다.

또한, 본 발명의 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물(CMC-9)은 독성 부작용이 없으므로 예방, 개선 및 치료 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 용할 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 또는 경제물(CMC-9)을 0.02 ~ 90 중량 %로 포함할 수 있다.

본 발명의 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 경제물(CMC-9)을 포함하는 학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 추출물 또는 경제물(CMC-9)을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 회석제로는, 락토즈, 딱스트로즈, 수크로스, 슬비름, 만니톨, 자일리, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미경질 셀룰로스, 폴리비닐 피클리, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 텔크, 마그네슘 스테아이트 및 광물유를 들 수 있다.

본 빌명에 따른 추출물 또는 경제물 (CMC-9)을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 법에 따라 산제, 과립제, 경제, 캡슐제, 혼탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경형제형, 외용제, 좌제 및 멀균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

본 빌명의 추출물 또는 경제물 (CMC-9)의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 추출물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 빌명의 범위를 정하는 것은 아니다.

또한 본 빌명의 박과 식물 추출물 또는 경제물 (CMC-9)은 기타 식품의 주, 부원 및 식품첨가제로서 사용이 가능하다.

또한 본 빌명은 비만 및 지질 관련 대사성 질환의 예방 및 개선에 효과적인 박식물 추출물 또는 경제물 (CMC-9) 및 식품학적으로 허용되는 식품 보조 첨가제를 유하는 건강기능식품을 제공한다.

본 빌명의 추출물 또는 경제물 (CMC-9)을 포함하는 조성물은 비만 및 지질 관련 사성 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 검, 비타민 복합제, 건강기능 식품류 등이 있다.

본 빌명의 추출물 또는 경제물 (CMC-9) 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

본 발명의 상기 추출물 또는 청제물(CMC-8)은 비만 및 지질 관련 대사성 질환의 방 및 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물 또는 청제물(CMC-8)의 양, 즉 일반적으로 본 발명의 건강기능 품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 % 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음 조성물은 100 mL당 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율을 가할 수 있다.

본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로, 필수 성분으로서 상기 추출물을 유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우 오시드 A, 글리시르하진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 칙색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 팩트산 및 의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 쿠로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조

위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 실시에 및 실험에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시에 및 실험에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### 시례 1. 박과 식물의 열수 추출물 제조

박과 식물 중 호박 줄기, 수박 줄기 및 수세미 줄기는 인근농원에서 구입하였으나, 건조된 각각의 호박 줄기, 수박 줄기 및 수세미 줄기 각 10 g에 100 mL의 증류수를 가한 후 90 내지 100 °C에서 외투막 (mantle)과 증류세트 (distilled set)를 사용하여 1 시간 동안, 3회 반복하여 가열 한 후, 여과자로 여과하여 각각의 열수 추출물을 제조하였으며, 여과액은 회전 진공 농축기를 사용하여 감압 농축하고, 동결 건조하여 각 건조 분말(호박 줄기의 열수 추출물 1.5 g, 수박 줄기의 열수 추출물 1.75 g, 수세미 줄기의 열수 추출물 1.2 g)을 수득하였고, 증류수에 100 mg/mL의 농도로 용해하여 사용하였다.

#### 시례 2. 호박 줄기의 헥산 가용성 분획물의 제조

상기 실시예 1에서 얻은 호박 줄기의 열수 추출물의 건조분말 200 g을 물 1 L로 분산시킨 후, 헥산 1 L 씩 가하고 3회 추출하여, 헥산 가용성 분획 3 L 및 물 가

성 분획 1  $\ell$  를 얻은 후, 헥산 가용성 분획은 여과지로 여과한 다음, 여과액은 회전 공기 농축기를 사용하여 감압 농축하고, 동결 건조하여 호박 줄기의 헥산 가용성 분획률 180 mg을 수득하였다.

#### 시례 3. 호박 줄기의 클로로포름 가용성 분획률의 제조

상기 실시예 2에서 얻은 호박 줄기의 물 가용성 분획 1  $\ell$  에 클로로포름을 1  $\ell$  을 더하고 3회 추출하여, 클로로포름 가용성 분획 3  $\ell$  및 물 가용성 분획 1  $\ell$  를 얻은 후, 클로로포름 가용성 분획은 여과지로 여과한 다음, 여과액은 회전 전공 농축기를 사용하여 감압 농축하고, 동결 건조하여 호박 줄기의 클로로포름 가용성 분획률 0 mg을 수득하였다.

#### 시례 4. 호박 줄기의 에틸아세테이트 가용성 분획률의 제조

상기 실시예 3에서 얻은 호박 줄기의 물 가용성 분획 1  $\ell$  에 에틸아세테이트 1  $\ell$  을 더하고 3회 추출하여, 에틸아세테이트 가용성 분획 3  $\ell$  및 물 가용성 분획 1  $\ell$  를 얻은 후, 에틸아세테이트 가용성 분획은 여과지로 여과한 다음, 여과액은 회전 전공 농축기를 사용하여 감압 농축하고, 동결 건조하여 호박 줄기의 에틸아세테이트 가용성 분획률 2.1 g을 수득하였다.

#### 시례 5. 호박 부단을 가용성 분획률의 제조

상기 실시에 4에서 얻은 호박 줄기의 물 가용성 분획 1  $\ell$ 에 부탄을 1  $\ell$  씩 가지고 3회 추출하여, 부탄을 가용성 분획 3  $\ell$  및 물 가용성 분획 1  $\ell$ 을 얻은 후, 부울 가용성 분획은 여과지로 여과한 다음, 여과액은 회전 진공 농축기를 사용하여 압 농축하고, 동결 건조하여 호박 줄기의 부탄을 가용성 분획물 7.4 g을 수득하였다.

#### 시례 6. 호박 줄기의 추출물로부터 경제물의 제조

상기 실시에 3에서 수득한 호박 줄기의 클로로포름 가용성 분획을 770 mg을 실카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 11개의 분획으로 분리하였다. 실리카겔 (Merk 제품 9385) 25 g을 내경 3cm, 길이 27 cm 컬럼에 충진하여 사용하였으며, 이동상로 헥산: 클로로포름: 메탄을 혼합용매 (16:15:1)를 사용하여 용출하였고, 얻어진 런 분획은 분획 1 (31 mg), 분획 2 (18 mg), 분획 3 (65 mg), 분획 4 (18 mg), 분획 5 (4 mg), 분획 6 (75 mg), 분획 7 (39 mg), 분획 8 (200 mg), 분획 9 (20 mg), 분획 10 (163 mg), 분획 11 (64 mg) 이었으며, 이들 분획 중 활성이 가장 우수한 분획 9를 리카겔 (Merk 9385) 2g, 이동상으로 클로로포름: 메탄을 혼합용매를 사용하여 기울 용리법으로 (30:1부터 10:1 까지 각 150 mL) 용출하였다.

이를 더욱 순수하게 분리하기 위하여, 얻어진 용출액을 HPLC를 수행하였다. 분조건으로는 컬럼  $\mu$ -본다백 C18 ( $\mu$ -Bondapak C18, Waters, 7.8 x 300mm)을 사용하였고, 이동상으로 40 % 메탄올을 2 mL/분의 유속으로 흘려보냈으며, 254 nm에서 UV 검기를 사용하여 26.8분에 분획 9를 용출하여 본 발명의 박과 식물 추출물로부터 분한 경제물을 수득하였다. 또한, 분획 9 피크에 해당하는 용출액을 합하여 농축하고

0 % 메탄을 이동상을 이용한 HPLC 조건으로 분석하였을 때 크로마토그램 상에서 분  
9 해당피크(용출시간 15분)가 주 피크로 판찰되었으며 (도 13 참조). 피크들의 면  
기준으로 판단할 때 분획 9(이하, CMC-9이라 함)의 순도는 93 % 정도였으며, TLC  
상(전개용매: 클로로포름: 메탄올=20: 1)은 도 12와 같았고,  $R_f$ 수치는 0.32를 나타  
었다.

#### 험예 1. 박과 식물 열수 추출물의 지방세포 분화 및 중성지방의 억제 효과

박과 식물 열수 추출물의 지방세포 분화 및 중성지방 억제 효과를 알아보기 위  
여, 상기 실시에 1의 호박 줄기의 열수 추출물을 시료로 하기와 같은 실험을 실시  
하였다.

지방세포 (3T3-L1)는 ATCC(American Tissue Culture Collection, USA)로부터 구  
하여 준비하였으며, 10 % FBS를 첨가한 RPMI 배지에서 배양하였다. 지방세포로 분  
하기 위하여 MDI (isobutylmethylxanthine, dexamethason, insulin) 칵테일  
ocktail)을 처리하였으며 이를 후에 배지를 교체하고, 인슐린(insulin)만을 처리하  
다. 이를마다 배지를 교체하였으며 교체시 인슐린을 같은 농도로 다시 처리하여 주  
다. MDI를 이용하여 지방세포의 분화를 유도 할 당시에 2.5 - 1000  $\mu$ g/ml의 농도로  
처리하였으며, 배지 교체시에 같은 농도로 처리하여 주었다. 대조군에는 트로글리타  
(Troglitazone, 시그마)을 처리해주었고, 시료군에는 각각 상기 실시에 1의 수세미  
줄기 추출물 1 mg/ml, 수박 줄기 추출물 1 mg/ml, 호박 줄기 추출물 1 mg/ml로 치  
해주는 한편, 또 다른 대조군으로 10  $\mu$ M의 SB203580(시그마)을 처리해주었다. 이  
8일이 경과하였을 때, 문화된 세포 내에 축적된 지방의 양은 오일 레드 오(Oil

d 0) 염색법에 의하여 염색하고, 흡광도 (Optical Density)를 이용하여 정량하였으

. 염색된 정도로 대조군을 100으로 보았을 때 저해율 (%)을 결정하였다.

그 결과, 미성숙 지방세포 3T3-L1에 MD1를 처리하면, 지방세포로 분화가 유도되  
증성지질이 축적된 것을 확인하였으며, 이때 대조군으로 트리글리터존을 처리해  
군에서는 증성지질이 더욱 많이 생성되어 붉은 색의 강도가 더해졌으며, SB203580  
처리해 준 군에서는 증성지질이 생성되지 않은 것을 확인하였다. 또한, 박과 식물  
출물 즉, 호박 줄기 추출물, 수박 줄기 추출물 및 수세미 줄기 추출물을 처리한 경  
. 용량에 비례하여 증성지질의 양이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 호박 줄기  
출물에서 그 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다(도 1a 및 1b 참조).

#### 현제 2. 호박 줄기 각 분획물의 지방세포 분화 및 증성지방 억제 효과

상기 실시예 3의 호박 줄기 클로로포름 가용성 분획물, 실시예 4의 호박 줄기  
탈아세테이트 가용성 분획물 및 실시예 5의 호박 줄기 부탄을 가용성 분획물의 지  
세포 분화 및 증성지방 억제 효과를 측정하기 위하여 상기 실험에 1과 동일한 방  
으로 실험을 수행하였다. 이 때 호박 줄기의 클로로포름 가용성 분획물, 에틸아세  
이트 가용성 분획물 및 부탄을 가용성 분획물은 각각 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였

그 결과, 하기 도 2a 및 2b에서 볼 수 있는 것처럼, 호박 줄기의 클로로포름 가  
성 분획물, 에틸아세테이트 가용성 분획물에서 지방 세포 분화 및 증성지방 저해효

를 나타내었으며, 특히 호박 즙기의 글로로포름 가용성 분획물에서 지방세포의 분화가 현격히 억제된 것을 확인하였다.

#### 험예 3. 호박 즙기의 추출물로부터 분리한 경제물(CMC-9)의 지방세포 분화 및 성지방 억제 효과

상기 실시에 6에서 호박 즙기의 글로로포름 분획물로부터 분리한 경제물(CMC-9) 지방세포 분화 및 중성지방 억제 효과를 알아보기 위하여, 상기 실험에 1과 같은 법으로 실험을 수행하였다.

그 결과, 미성숙 지방세포 3T3-L1에 MDI를 처리하면, 지방세포로 분화가 유도되어 중성지질이 축적된 것을 확인하였으며, 이때 대조군으로 트로글리타존(TZD, 시그마, 미국)을 처리해 준 군에서는 중성지질이 더욱 많이 생성되어 짙은 색의 강도가 해졌으며, SB203580(시그마, 미국)을 처리해 준 군에서는 중성지질이 생성되지 않았음을 확인하였다. 또한, 상기 실시에 6의 경제물(CMC-9)을 처리한 경우에서 지방세포의 분화와 중성지방의 축적이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(도 3참조).

#### 험예 4. 박과 식물 추출물의 지방세포 분화시의 유전자 발현 조절 효과

박과 식물 추출물의 지방세포분화시의 유전자 발현 조절 효과를 측정하기 위하여 상기 실시에 1의 호박 즙기의 열수 추출물을 시료로 하기와 같은 실험을 실시하였다.

먼저, 미성숙 지방세포 3T3-L1에 MDI를 처리하여 지방세포로의 분화를 유도함과 동시에 PPAR $\gamma$ 의 활성제(activator)인 트로글리타존(Troglitazone, 시그마, 미국), p38 저해제(inhibitor)로서 세포분열을 억제하는 SB203508(시그마, 미국)을 대조으로 처리하였으며, 실험군으로는 상기 실시에 1의 호박 줄기의 열수 추출물(이하, 105 라고 함)을 10 mg/ml, 100 mg/ml, 1 mg/ml로 각각 그 농도를 달리하면서 처리하였다. 각각의 약물을 투여한 세포들은 2일 간격으로 배지를 갈아주면서 10일간 37에서 배양하였다. 배양된 세포들은 차가운 식염수로 2회 세척해 준 후, 트리졸 시(Trizol agent)으로 RNA를 추출하여, 역전사 효소(reverse transcriptase)로 역전하여 cDNA를 얻었으며, 이렇게 얻어진 cDNA로부터 PPAR $\alpha$ , ACOI, 티올레이즈(thiolase), Apo C-III, SCD-1, GAPDH등을 PCR을 통해 증폭하여, 아가로오스 젤(gelose gel)에 전기영동하여 증폭된 유전자의 밀현 차이를 비교하였다. 각 유전자 쪽에 이용된 프라이머의 염기서열은 다음과 같으며, 이는 서열목록 1 내지 12에 나온다.

PPAR $\alpha$  : 5'-GTGACAGACAACGGCAGTCC, 3'-GGGCCACACCTTGACTTGTA,

ACO I: 5'-CTCACTCGAAGCCAGCGTTAC, 3'-GGCCCATCTCCGTCTG,

Thiolase : 5'-CGCTAGTTACTTGATGCATAC, 3'-TGGCTCAGCTGTTAGG,

Apo C-III : 5'-GGGCTCTGTGCAGGGCTACAT, 3'-AGAAGCCGGTGAACTT,

SCD-1: 5'-ACATGTCTGACCTGAAAGCCGAGAA,

3'-AGCTACTCTTGACTCCGTCTCC,

GAPDH : 5'-GCCTTCCGTGTTCTACCC, 3'-AGCCGTATTGTCATTGTCATACC

상기 실험결과, 도 4에 나타낸 것처럼 PG105를 1  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여준 세에서는 PPAR $\alpha$ 의 발현이 증가되었으며, PPAR $\alpha$ 에 의하여 활성화된다고 알려진바 있디올레이즈와 ACO I의 발현도 증가하였고, Apo CIII의 발현은 감소하는 것을 확인 수 있었다.

#### 험에 5. 박과 식물 추출물, 각 분획물 및 경제물 (CMC-9)의 PPAR $\alpha$ 활성화 효과

박과 식물 추출물, 각 분획물 및 경제물이 PPARs의 활성 조절할 수 있는지 조사하기 위하여 상기 실시에 2의 호박 줄기의 혁산 가용성 분물, 실시에 3의 호박 줄기의 클로로포름 가용성 분획물, 실시에 4의 호박 줄기의 텔아세테이트 가용성 분획물 및 실시에 6의 경제물 (CMC-9)을 시료로 하기와 같은 험을 수행하였다.

먼저, CV-1 세포에 tkPPRE 투시퍼레이즈 리포터 플라스미드만을 형질 전환한 군 리포터 플라스미드와 PPAR 알파, 델타, 또는 감마를 발현하는 벡터를 동시에 형질 전환시킨 후, 24시간 후에 PG105 및 상기 각 분획물을 각각 처리하여 주고 24시간에 세포를 수확하여 투시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 대조약물로는 PPAR $\alpha$ 인 경우 폐노파이브레이트 (F6020-100G, 시그마)를 100  $\mu$ M 농도로 처리하였으며, PPAR $\delta$ 의 경우 GW501516 (시그마)을 10  $\mu$ M 농도로 사용하였으며, PPAR $\gamma$ 의 경우에는 트로글리타 (T2573, 시그마)을 100  $\mu$ M 농도로 사용하였다.

그 실험결과 하기 도 5에 나타낸 것처럼, tkPPRE만을 처리해준 군에서는 투시페이즈 활성을 확인할 수 없었으나, PPAR $\alpha$ 를 동시에 형질 전환한 군에서는 클로로포문획물과 혼산 분획물에서 투시페레이즈 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 는 에탄올 용매로 처리해 준 음성 대조군의 60배 가량 강력한 것이며, 대조 약물인 노파이브레이트(시그마) 보다 5배 이상 강력하게 활성화되는 것을 알 수 있었다. AR $\delta$ 를 형질 전환한 경우에는 혼산 분획물을 처리한 군에서 투시페레이즈 활성이 배 높게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 이는 대조 약물인 GW501516과 비슷한 수 이었다. PPAR $\gamma$ 를 형질 전환한 경우에는 PG105, 각 분획물 및 경제용(CMC-9)이 이 활성화시킬 수 없었다.

이와 같은 결과로 박과 식물 추출물이 지방 대사를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다.

#### 험예 6. 고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 박과 식물 추출물의 중성지방 축적 억

##### 효과

고지방 식이를 섭취한 생쥐에서 박과 식물 추출물의 지질대사 조절 작용을 조사하기 위해, PG105를 시료로 하기와 같은 실험을 수행하였다.

##### 1. 전단계

먼저, 체중 18-20 g의 8내지 10주령 C57/BL 마우스(Jackson Lab에서 구입, 미국)를 환기되는 상자에 넣은 후, 5개의 군으로 나눈 다음, 1군에는 정상적인 사료를 굽하였으며, 나머지 4개의 군에는 45% 이상의 지방(Jackson Lab, 미국)을 함유

고 있는 고지방식이 사료를 공급하였다. 그 후 제1군과 2군은 음용수(D.W.)를 처리되었으며, 3군에는 본 발명의 실시에 1에서 제조된 PG105 8 mg을 매일 16주 동안 경루여하였으며, 제 4군은 제니칼(Xenical, 로슈) 40  $\mu$ g을, 5군은 리덕틸(Reductil, 보트) 5  $\mu$ g을 매일 경구 투여하였다. 투여한 지 6주와 13주에 각각 혈액을 채취하여 혈 중 중성지질 및 콜레스테롤의 양을 측정하였으며, 13주에 생쥐를 치사 한 후, 혈액을 분리하여 축적된 중성지질의 양을 측정하였고, 지방 조직과 간으로부터 mRNA를 리한 후, RT-PCR 방법을 이용하여 지방의 흡수, 대사 생합성에 관련된 유전자의 발양상을 조사하였다.

## 2. 혈중 지질 및 콜레스테롤에 관한 효과

실험동물에 각 대조약물 및 시료를 투여한 지 6주와 13주에 각각 혈액을 채취하여 혈 중 중성지질 및 콜레스테롤의 양을 측정한 결과, 제 2군인 대조군(D.W.)의 경에는 6주와 13주의 혈 중 지질의 농도가 각각 134.67 mg/dL, 169.33 mg/dL 이었으며, 고지방 식이를 하지 않은 생쥐에 비해 1.66 배 높은 농도였다. 이에 반하여 제 3인 PG105를 투여한 군은 6주와 13주의 혈 중 중성 지질농도는 94 mg/dL, 90 mg/dL로서, 고지방 식이를 하지 않은 생쥐와 비슷한 수준을 유지하는 것을 확인하였다(도 및 6b 참조).

또한, 혈 중 콜레스테롤 농도를 측정한 결과, 제 2군인 대조군(D.W. 투여한 군) 180 mg/dL를 나타낸 것에 비하여, PG105를 투여한 군은 148.6 mg/dL를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 7a 및 7b 참조).

## 3. 지방간에 관한 효과

실험동물의 간을 육안적으로 간을 살펴본 결과, 13주간 고지방 식이를 하면서  
듀수(D.W.) 만을 투여한 군에서는 황색빛을 나타내는 지방간을 확인한 반면, PG105  
투여한 군에서는 선홍색을 나타내는 간의 모습을 확인 할 수 있었다(도 8 참조).

#### 4. 간조직에 축적된 중성지질 농도에 관한 효과

실험동물에 각 대조약품 및 시료를 투여한지 13주 후의 간조직에 축적된 중성지질 농도를 측정하였다.

그 결과, 중류수(D.W.) 만을 음용한 경우에는 간조직에 축적된 중성지질 농도는  
17.53 mg/dL 를 나타내었으며, 이 값은 고지방식을 하지 않은 군에 비해 5배 높은  
으로서 간조직에 과량의 중성지질이 축적되었음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여,  
105를 투여한 경우에는 중성지질 농도가 46.15 mg/dL 를 나타내었으며, 이 값은 경  
범위에 속하는 값으로서 육안적 소견에서의 결과와 일치하였다(도 9 참조).

#### 5. 지방 대사 관련 유전자 발현에 대한 효과

박과 식물 추출물의 지방산의 흡수 및 분해에 관여하는 유전자 발현에 관한 효과  
를 조사하기 위하여, 지방 조직 및 간조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행  
으로서 지방대사에 관련된 유전자의 발현 변화 양상을 조사하였다.

그 결과, 지방조직에서 축적된 중성지방(triglyceride)을 지방산(fatty acid)  
로 분해하는 데 관여하는 효소(Schonfeld, G., et al., *Metab. Clin. Exp.*, 28,  
1001-1009, 1979)인 리포프로테인 라이페이즈(lipoprotein lipase, LPL)는 PG105의  
투여에 의해 그 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 리포프로테인 라이페이즈의 작  
용 저해하는 것으로 알려진 APO CIII 단백질(Windler E. et al., *J. Biol. Chem.*,

5. pp 8303-8307, 1980; Wang, C.S. et al., *J. Clin. Invest.*, 75, pp384-390.

85)의 발현도 저해된 것을 확인할 수 있었다(도 10a 및 10b 참조).

또한, 간조직에서 유전자 발현 변화 양상을 조사한 결과 도 10a에서 알 수 있는 것처럼, 스테아로일 코에이 디세추레이즈 (Stearoyl-CoA desaturase, SCD)의 발현이 저해 저하된 것을 확인하였다. 스테아로일 코에이 디세추레이즈는 팔미토일-코에이 (Palmitoyl-CoA) 와 스테아로일-코에이 (Stearoyl-CoA) 를 기질로 하여 이들 9번과 10번 이에 시스형 이중 결합드 (cis double bond) 을 도입하는 효소로서 팔미토레이오일-코에이 (Palmitoeyl-CoA) 와 올레일-코에이 (Oleoyl-CoA) 를 만들게 되며 (Enoch, H. G et al., *J. Biol. Chem.*, 251, pp5095-5103, 1976). 이들은 계속해서 인지질 (phospholipid), 콜레스테롤 (cholesterol), 중성지질 (triglyceride) 등을 구성하는데 용된다 (Ntambi, J.M., *J. Lipid Res.*, 40, pp1549-1558, 1999).

이와 같은 결과들은 PG105의 경우 투여가 지방의 분해는 촉진하는 반면 지방의 성은 저해할 수 있다는 것을 나타내었다.

#### 험예 7. 비만생쥐 모델 (db/db)에서의 체중 감소 및 지질 조절 효과

비만생쥐 모델 (db/db)에서 박과 식물 추출물의 체중 감소 및 지질 조절 효과를 살하기 위하여, 상기 PG105를 시료로 하기와 같은 실험을 수행하였다.

5 주령의 암컷 비만 생쥐는 잭슨 랩 (Jackson Lab, 미국)으로부터 구입하여 준비되었으며, 8 주령이 될 때까지 식수 및 사료를 제한하지 않고 안정화시킨 후, 6주간 쥐 당 PG105 8 mg을 100 mL의 증류수에 녹여 매일 경구로 투여하였고, 대조군에는

균한 증류수만을 투여하였다. 체중 변화는 일주일에 1회 측정하였으며, 식사 섭취는 매일 측정하였다. 3주와 6주의 혈액중의 지질의 양도 측정하였다.

그 결과, 도 11a에서 볼 수 있는 것처럼 PG105를 투여한 군의 경우 유의적인 체중 감소 효과를 확인하였으며, 6주까지 10-15 %의 체중이 감소하는 것을 확인하였다.

또한, 혈액 중의 중성 지질양을 측정한 결과 PG105를 투여한 군에서는 중성 지질이 감소하였으며, 그 양은 150 mg/dL였다(도 11b 참조).

#### 상례 1. 수세미 줄기의 열수 추출물의 체중 감소 및 지질 조절 효과

상기 실시예 1의 수세미 줄기의 열수 추출물의 건조분말이 체중 감소 및 지질 조절 효과를 알아보기 위하여 지원자 6명(여자 4명: 62, 45, 27, 29세, 남자 2명: 30, 30 세)을 대상으로 하여 약 2 주 동안 상기 수세미 줄기 열수 추출물 2 ~ 5 g/day를 경구 복용시키고, 체중 (kg) 및 허리둘레 (cm)를 측정하였다. 또한, 총지질 (total lipid) (mg/dL)은 비색법으로 검사킷트 (kit)로 총 지질 시약 (Total lipid agent, Vediees사, USA)을 사용하여 분광광도계 (Photometer, 모델명: Agilent 53, Aglient사, Germany)로 측정하였고, FFA (Free fatty acid) (uEq/L)는 효소법으로 검사킷트로 식디아 (Sicdia) NEFAYME (EKEN사, Japan)를 사용하여 히타크리 (Hitachi) (모델명: Hitachi 7150, Hitachi사, Japan)로 측정하였고, 콜레스테롤 (cholesterol) (mg/dL)은 효소법으로 검사킷트로 콜레스테롤 시약 (Cholesterol agent, Bayer사, USA)을 사용하여 ADVIA (모델명: ADVIA 1655, Bayer사, Japan)으로 측정하였고, VLDL-콜레스테롤 (VLDL-cholesterol) (mg/dL)은 면역비탁법으로 검사킷트로 BLF II (EKEN, Japan)을 사용하여 분광광도계 (모델명: Photometer 4020, Roche사,

Germany)로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤 (LDL-cholesterol) (mg/dL)은 검사kit로 L-콜레스테롤 (Roche사, Germany)을 사용하여 히타크리(모델명: Hitachi 7153, Hitachi사, Japan)로 측정하였고, HDL-콜레스테롤 (HDL-cholesterol) (mg/dL)은 검사kit로 직접 HDL-콜레스테롤 (Direct HDL-cholesterol) (Bayer사, UK)을 사용하여 ADVIA(모델명: ADVIA 1650, Bayer사, Japan)로 측정하였고, 중성지질 (Triglyceride) (mg/dL)은 효소법으로 검사kit로 중성지질 시약 (Triglycerides reagents, Bayer사, USA)을 용하여 ADVIA(모델명: ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 측정하였으며, 포도당 (Glucose) (mg/dL)은 효소법으로 검사kit로 포도당 헥스키나아제 (Glucose kinase, Bayer사, USA)를 사용하여 ADVIA(모델명: ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 측정하였고, SGOT (U/L) 와 SGPT (U/L)는 UV법으로 검사kit로 각각 AST 시약 (AST reagent, Bayer사, USA)과 ALT 시약 (ALT reagent, Bayer사, USA)을 사용하여 ADVIA(모델명: ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 측정하였다.

그 결과, 하기 표 1에 나타낸 것처럼 수세미 줄기의 열수 추출물은 체중 감소 저질 조절에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

	0 주	2 주	정상치
1중 (Kg)	67.7 ±0.9	66.9 ±0.3	
1회풀리 (cm)	84.9 ±.2	84.8 ±.6	
1지질 (mg/dL)	668.0 ±28.6	652.8 ±92.7	400-1000
FA (U/L/%)	602.3 ±40	232.2 ±47.5	170-585
리스테스 (ug/dL)	231.5 ±2.4	208.0 ±9.9	<220
LDL-콜리스테롤 (mg/dL)	242.0 ±4.9	225.6 ±6.2	15-200
DL-콜리스테롤 (mg/dL)	139.2 ±1.9	123.4 ±6.2	<130
DL-콜리스테롤 (ug/dL)	59.8 ±.3	55.8 ±.2	35-80
1성지질 (mg/dL)	171.3 ±3.1	144.6 ±6.7	<200
1도당 (ug/dL)	106.8 ±7.5	116.4 ±5.4	70-110
50T (U/L)	25.1 ±.1	21.3 ±.5	31 (F) 37 (M)
3PT (U/L)	25.6 ±2.5	22.8 ±1.3	31 (F) 40 (M)

따라서, 호박 줄기의 주출물인 PG105 뿐만 아니라, 등 속 식물인 수세미 줄기의 주출물에서도 항비만 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

하기에 상기 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

#### 제예 1. 주사제제의 제조

시예 1의 호박 줄기의 열수 주출물.....100 mg

다음 메타비설파이트.....3.0 mg

틸파라벤.....0.8 mg

로필파라벤.....0.1 mg

사용 멀균증류수.....적량

상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 2 mL로 한 후, 2 mL 용량의 앰플에 충  
하고 멀균하여 주사제를 제조한다.

#### 제예 2. 정제의 제조

시예 1의 호박 줄기의 열수 추출물.....200 mg

당.....100 mg

분.....100 mg

테아린산 마그네슘 적량

상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제  
한다.

#### 제예 3. 캡슐제의 제조

시예 1의 호박 줄기의 열수 추출물.....100 mg

당.....50 mg

분.....50 mg

크.....2 mg

테아린산 마그네슘.....적량

상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충  
하여 캡슐제를 제조한다.

#### 제예 4. 액제의 제조

시예 1의 호박 줄기의 열수 추출물.....1000 mg

당.....20 g

성화당.....20 g

돈향.....적량

정제수를 가하여 전체 1000 mL로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상

의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멀균시켜 액제를 제조한다.

#### 제예 5. 건강 식품의 제조

시예 1의 수세미 줄기의 열수 추출물.....1000 mg

타민 혼합물.....적량

타민 A 아세테이트.....70  $\mu$ g

타민 E.....1.0 mg

타민 B1.....0.13 mg

타민 B2.....0.15 mg

타민 B6.....0.5 mg

타민 B12.....0.2  $\mu$ g

타민 C.....10 mg

오틴.....10  $\mu$ g

코틴산아미드.....1.7 mg

산 ..... 50  $\mu$ g

토넨산 칼슘 ..... 0.5 mg

기질 혼합물 ..... 적량

산체1철 ..... 1.75 mg

화아연 ..... 0.82 mg

산마그네슘 ..... 25.3 mg

1인산칼륨 ..... 15 mg

2인산칼륨 ..... 55 mg

연산칼륨 ..... 90 mg

산칼슘 ..... 100 mg

화마그네슘 ..... 24.8 mg

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을

람직한 실사에로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하

. 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고.

상의 방법에 따라 건강식품 조성을 제조에 사용할 수 있다.

#### 제예 6. 건강 음료의 제조

시예 1의 수세미 즙기의 열수 추출물 ..... 1000 mg

연산 ..... 1000 mg

리고당 ..... 100 g

실농축액 ..... 2 g

우린 ..... 1 g

제수를 가하여 ..... 전체 900 mL

동상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85

에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉

멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성을 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바탕으로 실시예로 혼합 조성

했지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배

비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

#### 발명의 효과】

상술한 바와 같이, 본 발명의 박과 식물 추출물 또는 이로부터 분리한 경제품은

1)만 생쥐에서 체중 감소 작용을 나타내고, 중성 지질 및 콜레스테롤 저하 작용을

타내며, 페록시즘 증식 활성 수용체 알파 및 델타 (Peroxisome

oliferator-Activated Receptors alpha and delta, PPAR $\alpha$  &  $\delta$ )를 활성화하며, 스

로일-코에이 디세주레이즈 (Soyoyl-CoA desaturase)의 발현을 저하시킬 뿐 아니라,

성숙 지방 세포의 지방화 작용을 차단하므로, 비만 또는 과도한 지질 축적으로 발

하는 대사성 질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 의약품 및 건강기능 식품으로 사용

수 있다.

54-39

【구항 1】

(a) 건조한 박과 식물 줄기 또는 잎의 건조증량의 약 5배 내지 15배 분량의 물

가하고 열수추출한 후 감압여과하고 여과액은 회전진공능속기로 감압능속한 다음

결건조하여 박과 식물의 열수 추출물을 수득하는 제 1단계:

(b) 상기 박과 식물의 열수 추출물을 물에 혼탁한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸

세테이트, 부탄을 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 박과 식물의 각 용

에 가용한 분획물을 수득하는 제 2단계:

(c) 상기 박과 식물 클로로포름 가용성 분획물을 용출용매로 혼산-클로로포름:

탄을 (16:15:1)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Silica gel

luman chromatography)를 수행하여 11개의 분획으로 분리하는 제 3단계:

(d) 상기 분획 9를 용출용매로 클로로포름:메탄을 혼합용매를 사용하여 기울기

리법으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 용출한 후, 메탄올을 이동상으

세미-프립 HPLC (semi-prep HPLC)를 수행하여 수득한 용출액을 농축하여 정제물을

득하는 제 5단계로 이루어진 제조공정을 포함하는 제조방법으로 분리 수득되고, 도

와 같은 TLC 양상을 가지는 항지방화 (anti-adipogenecity) 활성 및 항비만

anti-obesity) 활성을 갖는 박과 식물 추출물로부터 분리한 정제물 (CMC-9).

#### • **부구항 2]**

항지방화(anti-adipogenecity) 활성 및 항비만(anti-obesity) 활성을 갖는 박과  
물의 추출물 또는 이로부터 분리한 상기 제1항의 경제물(CMC-9)을 함유하는 비만  
지질 관련 대사성 질환의 예방, 개선 및 치료에 유효한 약학 조성물.

#### • **부구항 3]**

제 2항에 있어서, 상기 박과 식물은 호박(*Cucurbita moschata* DUCH.), 수박(*Citrullus vulgaris* SCHRAD.), 수세미(*Luffa cylindrica* ROEM.), 참외(*Cucumis melo* var. *sakura* MAKINO), 박(*Lagenaria siceraria* STANDL. var. *depressa* HERA.) 등  
박과 식물로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### • **부구항 4]**

제 3항에 있어서, 상기 박과 식물은 호박, 수박, 수세미로부터 선택된 것인 약  
조성물.

#### • **부구항 5]**

제 3항에 있어서, 상기 박과 식물은 박과 식물의 줄기 또는 잎을 사용함을 특징  
로 하는 약학 조성물.

영구항 6]

제 2항에 있어서, 상기 비만 및 지질 관련 대사성 질환은 비만, 제 2형 당뇨병, 방간, 고지혈증, 심혈관 질환, 등백 경화증을 포함하는 것을 특징으로 하는 악학 성물.

영구항 7]

제 2항에 있어서, 상기 주출물은 조주출물 또는 비극성 용매 가용 주출물인 악 조성물.

영구항 8]

제 7항에 있어서, 상기 조주출물은 물로 추출한 것인 악학 조성물.

영구항 9]

제 7항에 있어서, 상기 비극성용매 가용 주출물은 헥산, 클로로포름, 디클로로 탄 또는 에틸 아세테이트로부터 선택된 용매로 추출한 것인 악학 조성물.

영구항 10]

제 7항에 있어서, 상기 비극성용매 가용 주출물은 클로로포름으로 추출한 것인 악학 조성물.

■구항 11]

제 2항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성을 총 중량에 대하여 상기 출물 또는 정제물을 0.02 ~ 90 중량 %로 포함하는 약학 조성을.

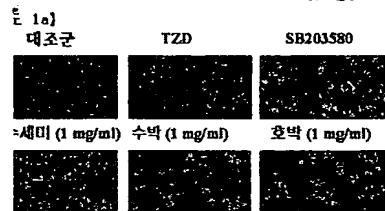
■구항 12]

비만 및 지질 관련 대사성 질환의 예방 및 개선에 효과적인 제 1항의 박과 식물 출물로부터 분리한 정제물(CMC-9) 또는 제 2항의 박과 식물 추출물과 식품학적으로 용되는 식품 보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품.

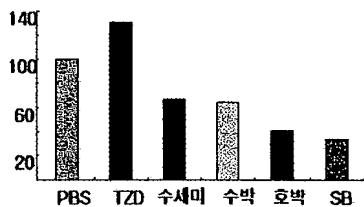
■구항 13]

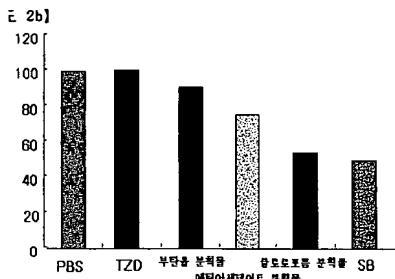
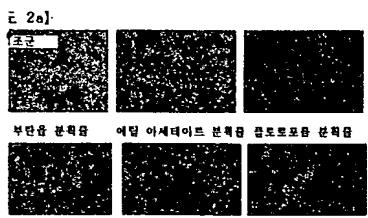
제 12항에 있어서, 건강음료인 건강기능식품.

【도면】

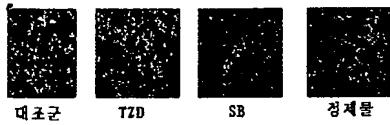


1b)

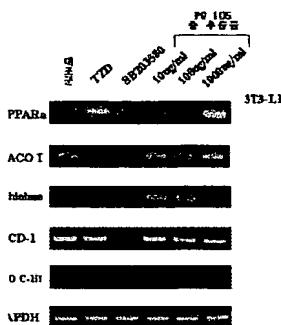




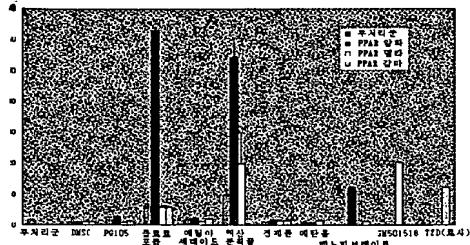
[E 3]



[E 4]

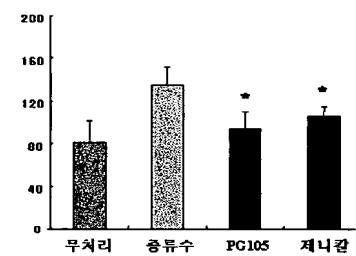


5]



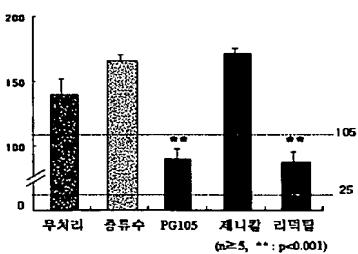
6a]

6. a)



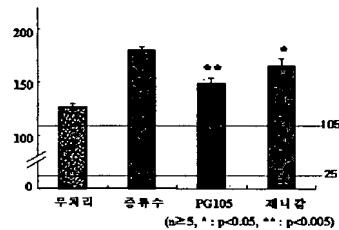
6b]

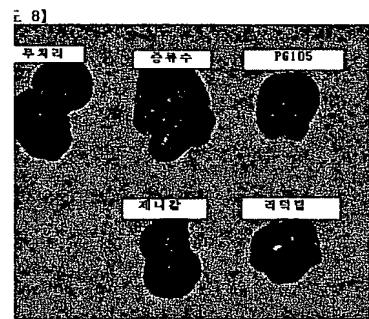
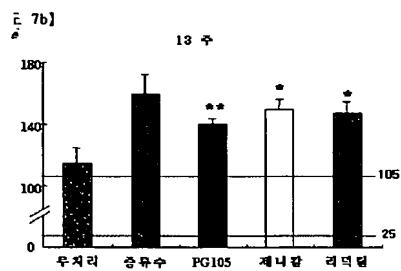
13 주

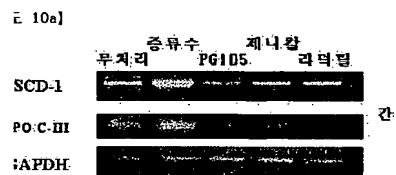
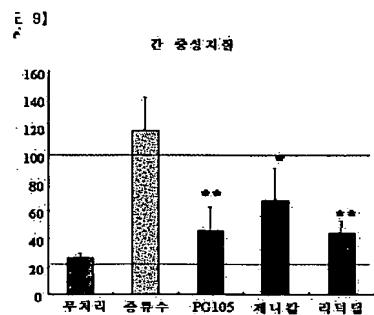


7a]

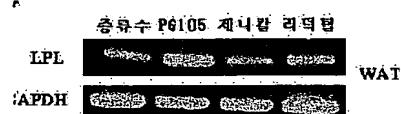
6 주



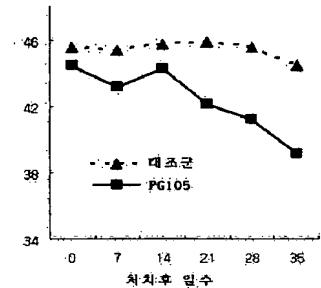


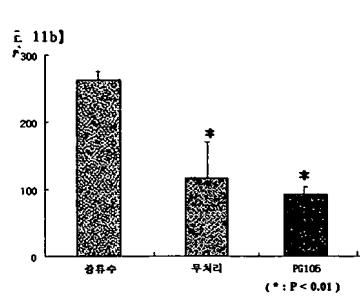


E 10b]

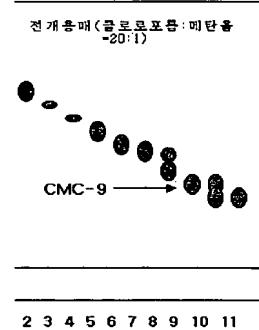


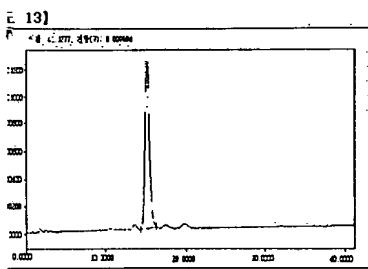
E 11a]





■ 12)





【서열목록】

▷ PANGENOMICS CO., LTD. <120> Composition comprising the extract of Cucurbita spe. or  
ined extract isolated therefrom having Anti-adipogenic and Anti-obesity  
ivity <160> 12 <170> Kopatentin 1.71 <210> 1 <211> 20 <212> DNA <213>

ificial Sequence <220> <223> PPARalpha primer1 <400> 1 ggacacgaca acggcagtcc  
<210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PPARalpha  
mer2 <400> 2 atgttcgtt ccacaccggg 20  
> 3 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> ACO I primer1  
> 3 ctcactcgaa gccagcgta c 21 <210>  
> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> ACO I primer2 <400> 4  
tgccctct accccgg 16 <210> 5 <211>  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Thiolase primer1 <400> 5  
tagttac ttgtatgcata c 21 <210> 6 <211>  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Thiolase primer2 <400> 6  
tttgtcga ctccgt 16 <210> 7 <211>  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Apo C-III primer1 <400> 7  
gtctgtg cagggttaca t 21 <210> 8 <211>  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Apo C-III primer2 <400> 8  
aaatggc cgaaga 16 <210> 9 <211>  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> SCD-1 primer1 <400> 9 acatgtctga  
aaaaagcc gagaa 25 <210> 10 <211> 25 <212>  
<213> Artificial Sequence <220> <223> SCD-1 primer2 <400> 10 cctctgtccctt cagtgttctc  
aa 25 <210> 11 <211> 19 <212> DNA  
> Artificial Sequence <220> <223> GAPDH primer1 <400> 11 gcctttccgtt ttccctaccc  
<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> GAPDH  
mer2 <400> 12 ccatactgtt acttatgcgg a 21

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003168

International filing date: 03 December 2004 (03.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2003-0087280  
Filing date: 03 December 2003 (03.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 02 February 2005 (02.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**